

## CERTIFICATION OF TRANSLATION

I, Elise Duvekot, a citizen of the United States of America, hereby certify that I am fully familiar with the German and English languages and that I am capable of translating from German into English. To the best of my knowledge and ability, the foregoing page constitutes an accurate and complete translation of the copy before me in the German language of the following:

the Priority Certificate on the Filing of German Patent Application No. 102 37 442.2 titled "Hochverzweigte, niedrig substituierte Stärkeprodukte".

I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true.

In witness whereof I sign,

September 16, 2007

*Date*

*Elise Duvekot*

*Signature of translator*



Translation by: **Duvekot Translators & Interpreters**  
131 Bloor Street West, Suite 803  
Toronto, ON M5S 1S3, Canada  
Phone: (+1) 647-435-1060  
Fax: (+1) 647-438-2978  
e-mail: LEDTRANS@CS.COM



**TRANSLATION**

Rec'd PCT/PTO 14 FEB 2005  
PCT/EP03/08411

10/524424

**THE FEDERAL REPUBLIC OF GERMANY**

---

[Stamp:]

Rec'd 22 AUG 2003

WIPO PCT

[Stamp]

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



**Priority Certificate on the Filing  
of a Patent Application**

**Application no.:** 102 37 422.2  
**Date of filing:** August 16, 2002  
**Applicant/Proprietor:** Fresenius Kabi Deutschland GmbH,  
Bad Homburg, Germany (DE)  
**Title:** Highly branched, low-substituted starch products  
**IPC:** G 08 B and A 61 K

**The appended documents are a true and precise reproduction of the  
original documentation of this patent application.**

Munich, July 21, 2003  
**German Patent and Trademark Office**  
**The President**  
By proxy

[Signed: illegible]

[Stamp:]  
**Ebert**

## CERTIFICATION OF TRANSLATION

I, Elise Duvekot, a citizen of the United States of America, hereby certify that I am fully familiar with the German and English languages and that I am capable of translating from German into English. To the best of my knowledge and ability, the foregoing page constitutes an accurate and complete translation of the copy before me in the German language of the following:

document dated August 15, 2002, issued by Fresenius Kabi Deutschland GmbH and titled "Hochverzweigte, niedrig substituierte Stärkeprodukte".

I further declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true.

In witness whereof I sign,

September 16, 2007

*Date*

*Elise Duvekot*

*Signature of translator*



Translation by:



**Duvekot Translators & Interpreters**  
131 Bloor Street West, Suite 803  
Toronto, ON M5S 1S3, Canada  
Phone: (+1) 647-435-1060  
Fax: (+1) 647-438-2978  
e-mail: LEDTRANS@CS.COM

# TRANSLATION

fr35 [*illegible on copy*]  
August 15, 2002  
lud/ho  
[*illegible on copy*]

## **FRESENIUS KABI DEUTSCHLAND GMBH**

Else Kröner-Strasse 1  
D-61352 Bad Homburg. v.d.H.  
Germany

---

**Highly branched, low-substituted starch products**

---

### **Highly branched, low-substituted starch products**

The present invention relates to highly branched, low-substituted starch products. In particular, the invention relates to starch products that are suitable for use as a colloid osmotic agent in peritoneal dialysis and a volume replacement means (plasma expander).

Up until now, mainly glucose has been employed as an osmotic agent in peritoneal dialysis. This substance has proven its worth especially for brief, intermittent use (retention time of about 2 to 3 hours), it is non-toxic, highly compatible with other constituents of the dialysis solution and can be sterilized by steam under non-alkaline conditions. Besides, glucose is relatively inexpensive. However, glucose is not an ideal agent since it can cause undesired side effects over the course of a peritoneal dialysis. For instance, unavoidable, non-physiologically low pH values and hyper-osmolar solutions cause irritations. The fast re-absorption into the blood results in high blood glucose and lipid values. This is why the ultrafiltration performance can only be maintained over relatively short periods of time.

Aside from the wish to avoid side effects and excessive stress to the peritoneal membrane (the frequent change of the dialysis solution entails an increased risk of peritonitis), there was a need to replace glucose by an agent that allows a longer retention time of the dialysis solution in the peritoneal cavity, thus reducing the stress for the patient. This endeavor made use of the insight that sufficient ultrafiltration performance and clearance of solutions are not achieved only by establishing an osmotic pressure but rather also by means of the so-called colloid osmotic pressure brought about by the macromolecules. As a result, it became possible to use dialysis solutions also in the iso-osmolar or hypo-osmolar range.

Towards this end, glucose polymers, among others, are employed that are obtained through the hydrolysis of unmodified corn starch and that have molecular weights of approximately 20,000 (icodextrin).

The retention times of such dialysis solutions range from about 8 to 12 hours. Even though macromolecules are also re-absorbed via the lymphatic system through the mechanism of active absorption and then degraded, the catabolic products in the form of maltose and glucose oligomers are considered to be uncritical.

A major drawback of such hydrolyzed starch fractions, however, is the fact that slightly branched or unbranched starch fragments tend to retrogradation – which is generally known in the case of the amylose fraction of starch – and can lead to undesired precipitation. This is all the more applicable when high-amylose starches are selected as the starting point for the hydrolysates. Furthermore, under autoclaving conditions, maltodextrin-like starch products tend to form undesired and sometimes harmful by-products such as formaldehyde and aldonic acids.

Another prior-art agent that can be fundamentally employed for generating a colloid osmotic pressure is hydroxyethyl starch (HES), an oncologically active medium. When types within the molecular range from 40,000 to 450,000 and substitution degrees of 0.5 to 0.7 were studied, however, it was found to be a disadvantage that re-absorbed HES and fractions of it are stored in the spleen, lungs and liver, so that the use of HES as a colloid osmotic agent cannot be considered as unproblematic. This undesired storage of HES can be ascribed to the fact that the high substitution does not allow a complete degradation of HES by the body's own amylase.

At the present time, HES constitutes the most modern and most widespread volume replacement medium. In addition to the fact that the finished product has dif-

ferent compositions, a number of variants of the active ingredient are employed that differ in terms of their molecular weight as well as their substitution degree and substitution pattern.

Hydroxyethyl starches fundamentally stand out over other volume replacement media such as gelatins, dextrans or synthetic colloids for their high tolerability, which is due to the fact that the initial material used for HES is waxy corn starch, a special type of starch that consists of over 98% amylopectin and whose chemical structure is similar to the body's own storage material, glycogen. The remaining approximately 2% consists of somewhat or *[illegible on copy]* amylose.

Like glycogen, amylopectin is made up of glucose units that are bonded to each other via  $\alpha$ -1,4 bonds in the backbone chain and via  $\alpha$ -1,6 bonds in the branching sites. However, amylopectin with approximately 5%  $\alpha$ -1,6 bonds (on approximately every 20<sup>th</sup> glucose unit) is even much less branched than glycogen with 10% to 16%  $\alpha$ -1,4 bonds (every 6<sup>th</sup> to 10<sup>th</sup> glucose unit). Amylopectin is not water-soluble. If it were, it would be quickly degraded by the body's own amylases after the infusion and remain without effect. Amylopectin becomes water-soluble by means of, for example, etherification brought about by ethylene oxide or propylene oxide, whereby in addition – as a function of the degree of substitution (degree of etherification) – the degradation is slowed down by amylase which, together with the established molecular weight, determines the duration of effect of HES.

A major drawback of all known hydroxyethylated or hydroxypropylated starch types is that a complete degradation by amylase is not possible because of the substitution by hydroxyethyl or hydroxypropyl groups which takes place to varying degrees. As a result, residual fragments remain in the organism and these are only eliminated very slowly or else are stored in various tissues or organs such as, for example, the spleen, liver or lungs. This can have a particularly critical effect in the

case of higher and more prolonged doses. It is assumed that the known side effects such as flank pain or itching can be ascribed to this, among other things.

An improvement regarding the storage problem was obtained by means of a HES type having the specification 130/0.4, whose substitution pattern was optimized by a special production method in such a way that the fraction of hydroxyethyl side groups that is relevant for the amylase attack was retained but, at the same time, the total substitution degree was lowered.

Consequently, the storage of HES in organs or tissues can be reduced markedly although not completely.

Therefore, the invention was based on the objective of putting forward an agent that has the advantageous properties of the hydroxyethyl or hydroxypropyl starches known from the state of the art but that, in addition, no longer has the disadvantageous property of storing residual fragments in organs and tissues.

It has been found that this objective can be achieved with a highly branched, low-substituted starch product, that is to say, with a starch that exhibits a significantly higher degree of branching than amylopectin or that has the  $\alpha$ -1,6 degree of branching of glycogen or that even exceeds this and that has a degree of substitution MS of only 0.05 to 0.3. The starch products according to the invention preferably have a degree of branching of 8% to 20%, which can be achieved by means of a transglucosidation step employing branching enzymes. In principle, any starch can be employed as the starting material for this purpose, but preference is given to wax starches with a high content of amylopectin or the amylopectin fraction itself. Like the HES types clinically used in the state of the art, the mean molecular weight (Mw) preferably lies within the range from 10,000 to 450,000 and the C<sub>2</sub>-to-C<sub>6</sub> ratio within the range from 4 to 20, depending on the application. Preferably,



molecular weights within the range from 10,000 to 40,000 are used for continuous ambulatory peritoneal dialysis (CAPD) and molecular weights within the range from 40,000 to 450,000 are employed for use as plasma expanders. The preferred C<sub>2</sub>-to-C<sub>6</sub> ratio lies in the range from 5 to 9. The formation of undesired by-products such as, for instance, aldonic acids and formaldehyde, can be avoided by the method of reduction or oxidation of the aldehyde groups at the reducing end, a procedure known to the person skilled in the art.

Due to the high degree of branching of the starch products according to the invention, their water-solubility is raised to such an extent that a higher hydroxyethyl or hydroxypropyl substitution can be dispensed with for purposes of keeping the starch product in the form of a solution. For one thing, this avoids a retrogradation and the associated precipitations since these were only observed in slightly branched or unbranched amylose-like structural constituents that are not substituted or else only very slightly substituted. Thanks to the low substitution by hydroxyethyl or hydroxypropyl groups, there is little or no formation of higher molecular residual fragments that are generated through degradation by the body's own amylase and that can no longer be degraded by amylase and end up being stored in the organs or tissues. Moreover, due to the high physiological similarity to the body's own glycogen in comparison to HES types found in the state of the art, considerably fewer side effects or none at all can be expected.

Starting with a suitable highly branched starch, methods familiar from the state of the art can be employed with minimal effort to produce a colloid osmotic agent that lends itself for peritoneal dialysis, whereby said agent can be easily combined in a likewise known manner with various electrolytes, amino acids, lactate, acetate, bicarbonate and the like, as well as with other osmotically active agents such as, for example, glucose. By the same token, by appropriately selecting the molecular weight, a product can be obtained for use as a volume replacement means whose

volume effect is additionally promoted by the spatial expansion of such a highly branched starch product. Moreover, the retention time in the body can be established through the selection of the molecular weight distribution.

The products according to the invention are characterized in that they have the advantages of the hydroxyethyl starches employed for volume therapy known from the state of the art but they no longer exhibit their typical drawbacks. This is particularly advantageous in areas of application where volume replacement means have to be administered in large volumes within a short time or over a long time span such as, for example, in the case of sudden deafness. Whereas, for instance, the upper limit for the administration of a HES having the specification 130/0.4 is currently 2 grams per kilogram of body weight per day, larger quantities of the products according to the invention can be administered without any problems.

The products according to the invention are also characterized in that they entail the advantages of known colloid osmotic agents for peritoneal dialysis without exhibiting the disadvantages of potential retrogradation or the formation of harmful by-products.

Through a modification of the mean molecular weight, the products according to the invention can be used in volume therapy as well as in peritoneal dialysis.

The capabilities of the starch product according to the invention will be explained in greater detail with reference to the example below.

Example:

**Study of storage in the tissues following repeated administration**

A controlled study was performed in 48 female rats. Following a daily infusion of a  $^{14}\text{C}$ -marked starch product according to the invention (mean molecular weight Mw of 25,500 Daltons; molar substitution of 0.15; degree of branching of 12.4 mol-%) or  $^{14}\text{C}$ -marked HES 130/0.4 (mean molecular weight of 135,600; molar substitution of 0.41; degree of branching of 6.29 mol-%; in each case, 1 gram per kilogram of body weight) on 24 consecutive days, the liver, lungs, spleen and kidneys were examined for storage in the tissues after 2, 10, 22 and 46 days after the last administration. The findings are compiled in the table below.

As can be seen in the table, in comparison to HES 130/0.4, a significantly lower storage of the product according to the invention ( $P < 0.01$ ) was found in all of the tissues examined. These results clearly confirm that the product according to the invention leads to a markedly reduced storage in the tissues vis-à-vis the comparative product.

Sample	Starch product	HES 130/0.4	Starch product	HES 130/0.4	Starch product	HES 130/0.4	Starch product	HES 130/0.4
	2 days after last administration		10 days after last administration		22 days after last administration		46 days after last administration	
[illegible]	0.20	1.30	0.06	0.31	0.02	0.20	0.01	0.06
[illegible]	0.01	0.06	0.01	0.04	0.00	0.02	0.00	0.02
[illegible]	0.02	0.08	0.01	0.04	0.01	0.03	0.00	0.03
[illegible]	0.02	0.13	0.01	0.05	0.00	0.01	0.00	0.01

### Patent Claims

1. A modified hydroxyethyl-substituted or hydroxypropyl-substituted starch product for clinical use, characterized in that the starch product has a degree of branching of 8 mol-% to 20 mol-% and a degree of substitution MS within the range from 0.05 to 0.3.
  2. The starch product according to Claim 1, characterized in that it has a mean molecular weight (Mw) within the range from 10,000 to 450,000.
  3. The starch product according to Claim 2, characterized in that it has a mean molecular weight (Mw) within the range from 10,000 to 40,000.
  4. The starch product according to Claim 2, characterized in that it has a mean molecular weight (Mw) within the range from 40,000 to 450,000.
- 
5. The starch product according to any of Claims 1 to 4, characterized in that the C<sub>2</sub>-to-C<sub>6</sub> ratio lies within the range from 4 to 20.
  6. The starch product according to Claim 5, characterized in that the C<sub>2</sub>-to-C<sub>6</sub> ratio lies within the range from 5 to 9.
  7. The starch product according to any of Claims 1 to 6, characterized in that it is a hydroxyethylated starch.

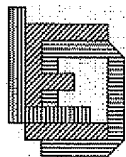
8. The starch product according to any of Claims 1 to 7, characterized in that its reducing ends are inactivated by means of oxidation or reduction.
9. The use of the starch product according to any of Claims 1 to 8 as a colloid osmotic agent in peritoneal dialysis.
10. The use of the starch product according to Claim 9, characterized in that it has a mean molecular weight (Mw) ranging from 10,000 to 40,000.
11. The use of the starch product according to any of Claims 1 to 8 as a plasma expander.
12. The use of the starch product according to Claim 11, characterized in that it has a mean molecular weight (Mw) ranging from 40,000 to 450,000.

## **Abstract**

The known hydroxyethylated or hydroxypropylated starch types used as colloid osmotic agents in peritoneal dialysis or as volume replacement means (plasma expanders) entail the drawback that a complete degradation by amylase is not possible because of the substitution by hydroxyethyl or hydroxypropyl groups which takes place to varying degrees. As a result, residual fragments remain in the organism and these are only eliminated very slowly or else are stored in various organs or tissues, especially in the case of higher and/or more prolonged doses.

According to the invention, these disadvantageous properties can be prevented to a very large extent by means of a highly branched, low-substituted starch product, that is to say, with a starch that exhibits a significantly higher degree of branching than amylopectin or that has the  $\alpha$ -1,6 degree of branching of glycogen or that even exceeds this and has a degree of substitution MS of only 0.05 to 0.3.

**Translation by:**



**Leonardo and Elise Duvekot  
Translators & Interpreters  
131 Bloor Street West, Suite 803  
Toronto, ON · M5S 1S3 · Canada  
Phone no.: [+1] (647) 435 1060  
Fax no.: [+1] (647) 438 2978  
e-mail: ledtrans@cs.com**



⑪ **BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT**

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 102 35 954 A 1**

⑲ Aktenzeichen: 102 35 954.7  
⑳ Anmeldetag: 6. 8. 2002  
㉑ Offenlegungstag: 6. 3. 2003

⑮ Int. Cl. 7:  
**A 61 K 31/718**  
C 08 B 37/06  
A 61 K 49/00  
C 12 Q 1/00  
A 01 N 1/02

**DE 102 35 954 A 1**

⑮ Innere Priorität:

101 41 099. 5

22. 08. 2001

⑰ Anmelder:

Supramol Parenteral Colloids GmbH, 61191  
Rosbach, DE

⑱ Vertreter:

Luderschmidt, Schüler & Partner, 65189 Wiesbaden

⑲ Erfinder:

Sommermeyer, Klaus, Dr., 61191 Rosbach, DE

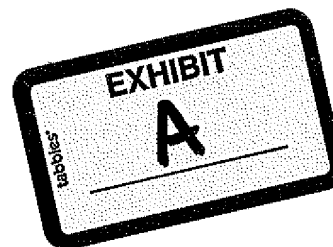
**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

⑤4 Hypervverzweigtes Amylopektin zum Einsatz in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung von Säugern oder in Diagnostizierverfahren, insbesondere zur Verwendung als Plasmavolumenexpander

⑤7 Verwendung von hypervverzweigtem Amylopektin, das einen mittleren Verzweigungsgrad zwischen > 10 und 26 Mol-% und ein Molekulargewicht  $M_w$  im Bereich von 40000 bis 800000 Dalton aufweist, und dessen Derivate in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers oder in Diagnostizierverfahren, bevorzugt als Plasmavolumenexpander.

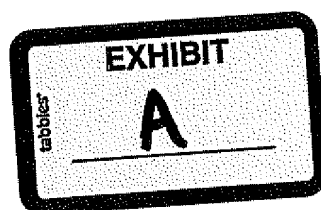
Plasmavolumenexpander auf Basis von hydroxyethyliertem Amylopektin weisen, bedingt durch die Hydroxyethylierung, bislang noch den Nachteil der nicht vollständigen Metabolisierbarkeit und damit vorübergehender Gewebeschädigung, die mit Nebenwirkungen verbunden ist, auf. Es sollen neue Plasmaexpander auf Basis von Polysacchariden gefunden werden, die diesen Nachteil nicht aufweisen.

Verbesserte, vollständig metabolisierbare Plasmaexpander auf Basis von hypervverzweigtem Amylopektin erhält man beispielsweise dadurch, dass native Pflanzen-Amylopektine durch Transglycosylierung so verändert werden, dass der einstellbare, hohe Verzweigungsgrad eine Steuerung des Serum- $\alpha$ -Amylaseabbaus ermöglicht, so dass keine oder nur sehr geringfügige Hydroxyethylierung notwendig ist.



Page 1

**DE 102 35 954 A 1**



DE 102 35 954 A 1

Page 2

1

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft den Einsatz von hypervverzweigtem Amylopektin.

[0002] Speziell richtet sich die Erfindung auf eine neuartige Verwendung von hypervverzweigtem Amylopektin, das einen bestimmten Verzweigungsgrad und ein bestimmtes Molekulargewicht Mw aufweist.

[0003] In der Geschichte der Entwicklung der Plasmaplasmaexpander war es immer ein Ziel, die globuläre Struktur des natürlichen Trägers des kolloidosmotischen Druckes im Serum, des Albumins, zu erreichen. Dieser globulären Struktur kommt das Glycogen, welches ebenfalls als natürliches Speicherpolysaccharid im menschlichen Organismus vorkommt, nahe. Seine globuläre Struktur erreicht das Glycogen durch seinen sehr hohen Verzweigungsgrad. Struktural stellt das Glycogen ein Glucosepolysaccharid dar mit in linearen Abschnitten  $\alpha$ -1,4 glycosidischen Bindungen an denen  $\alpha$ -1,6 glycosidische Verzweigungspunkte fixiert sind. Weil Glycogen selbst nicht als eine billige Rohstoffquelle zur Verfügung steht, schlug Wiedersheim 1957 vor, an dessen Stelle das geringer verzweigte Amylopektin als Ausgangsmaterial zur Herstellung des Plasmaexpanders Hydroxyethylstärke (HES) einzusetzen. Mittlerweile wird Hydroxyethylstärke in mehreren verschiedenen Typen sehr breit als Plasmaexpander eingesetzt. Die Entwicklung hat zu neuen Hydroxyethylstärke-Typen (HES-Typen) geführt, die einen optimalen Volumeneffekt aufweisen bei sonst minimalen Nebenwirkungen wie z. B. Beeinflussung der Gerinnung oder aber auch intermediäre Speicherung im Gewebe.

[0004] Die verschiedenen im Markt befindlichen HES-Typen unterscheiden sich im Bezug auf Molekulargewicht, mittleren Substitutionsgrad und Substitutionsmuster.

[0005] Trotz des beachtlichen Fortschritts, der mit diesen Entwicklungen erreicht wurde, verbleiben einige Nachteile auch bei den in den letzten Jahren optimierten HES-Typen, vor allem die nicht vollständige Metabolisierbarkeit.

[0006] Es ist bekannt, dass die Hydroxyethyl-Ethergruppe chemisch aber auch metabolisch außerordentlich stabil ist, so dass diejenigen Anhydroglucose-Einheiten der Hydroxyethylstärke, die Hydroxyethyl-Ethergruppen tragen, praktisch nicht metabolisierbar sind. Weiterhin ist bekannt, dass nur diejenigen  $\alpha$ -1,4 glycosidischen Bindungen im Hydroxyethyl-Stärke-Molekül durch die Serum- $\alpha$ -Amylase gespalten werden können, die durch nicht substituierte Glucoseeinheiten gebildet werden. Aus diesem Grunde ist festzustellen, dass selbst bei den optimierten HES-Typen eine minimale aber immer noch bemerkenswerte Gewebespeicherung zumindest über gewisse Zeiträume festgestellt werden kann.

[0007] Als weiterer Nachteil ist festzustellen, dass HES nicht die ideale globuläre Struktur des Albumins aufweist und deshalb seine Grenzviskosität bedeutend höher ist als die von Albumin. Eine niedrigere Viskosität ist bei einem Plasmaexpander deshalb wünschenswert, weil nach dessen Applikation in die Zirkulation die Gesamtblutviskosität im Sinne einer Erniedrigung beeinflusst werden würde.

[0008] Es bestand daher die Aufgabe, neue verbesserte Plasmaexpander auf Amylopektinbasis zu entwickeln, die die Nachteile der fehlenden vollständigen Metabolisierbarkeit des Amylopektinderivates Hydroxyethylstärke nicht aufweisen. Gleichzeitig sollte der neue Plasmaexpander eine mehr globuläre Struktur aufweisen und damit relativ niedrigviskose Lösungen bilden.

[0009] Es kann auch als Aufgabe der Erfindung angesehen werden, weitere Einsatzgebiete für bestimmte Amylopektine zu erschließen.

[0010] Diese Aufgaben sowie weitere nicht einzeln aufge-

2

führte Aufgaben, die sich jedoch zwanglos aus der einleitenden Erörterung ableiten lassen, werden durch den Gegenstand des Anspruchs 1 gelöst. Bevorzugte Ausgestaltungen der Erfindung sind Gegenstand der auf Anspruch 1 rückbezogenen Ansprüche.

[0011] Dadurch, dass man hypervverzweigtes Amylopektin, das einen mittleren Verzweigungsgrad zwischen  $> 10$  und  $25 \text{ mol}\%$  und ein Molekulargewicht Mw im Bereich von 40.000 bis 800.000 Dalton aufweist, und ggf. seine Derivate in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (also von Säugern) oder in Diagnostizierverfahren einsetzt, gelingt es auf nicht ohne weiteres vorhersehbare Weise zum einen für hypervverzweigtes Amylopektin eine Reihe von neuen und interessanten Anwendungen im medizinischen Bereich zu erschließen. Zum anderen wird speziell bezogen auf den Sektor "Plasmaplasmaexpansion" ein nahezu idealer, weit weniger zu gefährlichen Nebenwirkungen führender, Ersatzstoff für die zur Zeit in der Praxis noch gängigen HES-Produkte auf Stärkebasis bereit gestellt.

[0012] Im Bezug auf die Plasmaplasmaexpansion wurde nämlich im Rahmen der Erfindung durch aufwendige Studien und Untersuchungen festgestellt, dass die Restfraktionen von Hydroxyethylstärke im Blutstrom und im Urin einige Stunden oder sogar Tage nach Applikation eines Plasmaexpanders eine starke Zunahme des Verzweigungsgrades aufwiesen im Vergleich zur original infundierten Hydroxyethylstärke (HES-Produkt). So stiegen die Verzweigungsgrade, ausgedrückt als  $\text{mol}\%$  der Anhydroglucose, die Verzweigungspunkte tragen, von ca.  $5 \text{ mol}\%$  auf über  $7 \text{ mol}\%$  2 Stunden nach Applikation und auf  $8 \text{ mol}\%$  7 Stunden nach Applikation an. Gleichzeitig zeigte sich 48 bzw. 42 Stunden nach Infusion in den Urin-Sammelfraktionen ein noch höherer Verzweigungsgrad von 9 bzw.  $10 \text{ mol}\%$ . Dieses Phänomen wurde beobachtet unabhängig von Molekulargewicht, Substitutionsgrad oder Substitutionsmuster der applizierten Hydroxyethylstärke. Das bedeutet, dass diese Fraktionen sich beim Abbau immer mehr einer Glycogen-ähnlichen Struktur bzw. Verzweigung nähern, die in der Literatur mit ca. bis zu  $10 \text{ mol}\%$  Verzweigung angegeben wird.

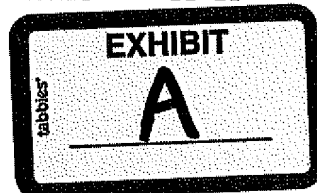
[0013] Überraschenderweise wurde nun gefunden, dass die relative Stabilität der  $\alpha$ -(1,6)-Verzweigung in Amylopektin und in Derivaten davon ausgenutzt werden kann, um den Abbau von Amylopektin gegenüber dem dominanteren  $\alpha$ -Amylase-Abbau sowohl zu reduzieren, dass ein vollständig abbaubares Polysaccharid hergestellt werden kann, welches aber immer noch die Eigenschaften eines idealen Plasmaexpanders im Bezug auf Pharmakokinetik bzw. Volumeneffekt aufweist.

[0014] Die Erfindung umfasst daher die Verwendung von hypervverzweigten Amylopektinen und von Derivaten solcher hypervverzweigten Amylopektine auf dem medizinischen Sektor.

[0015] Unter Amylopektinen versteht man dabei zunächst ganz allgemein verzweigte Stärken oder Stärkeprodukte mit  $\alpha$ -(1-4)- und  $\alpha$ -(1-6)-Bindungen zwischen den Glucosemolekülen. Die Verzweigungen der Kette erfolgen dabei über die  $\alpha$ -(1-6)-Bindungen. Diese sind bei natürlich vorkommenden Amylopektinen etwa alle 15-30 Glucosesegmente unregelmäßig vorhanden. Das Molekulargewicht von natürlichem Amylopektin liegt sehr hoch im Bereich von  $10^7$  bis zu  $2 \times 10^8$  Dalton. Man geht davon aus, dass auch Amylopektin in gewissen Grenzen Helices bildet.

[0016] Man kann für Amylopektine einen Verzweigungsgrad definieren. Das Maß für die Verzweigung ist das Verhältnis der Zahl von Molekülen Anhydroglucose, die Verzweigungspunkte ( $\alpha$ -(1-6)-Bindungen) tragen, zur Gesamt-





## DE 102 35 954 A 1

Page 3

3

4

zahl Moleküle der Anhydroglucose des Amylopektins, wobei dieses Verhältnis in mol-% ausgedrückt wird. In der Natur auftretendes Amylopektin weist Verzweigungsgrade von ca. 4 mol-%. Allerdings ist bekannt, dass Cluster und Molekülabschnitte von Amylopektin bei isolierter Betrachtung einen geringfügig höheren Verzweigungsgrad aufweisen als naturgemäß der Durchschnittsverzweigungsgrad.

[0017] Hyperverzweigte Amylopektine sind im Sinne der Erfindung nun solche Amylopektine, die einen über den aus der Natur für Amylopektine bekannten Verzweigungsgrad signifikant hinausgehenden Verzweigungsgrad aufweisen. Dabei handelt es sich beim Verzweigungsgrad in jedem Falle um einen Mittelwert (mittleren Verzweigungsgrad), da Amylopektine polydisperse Substanzen sind.

[0018] Solche hyperverzweigte Amylopektine weisen signifikant höhere Verzweigungsgrade, ausgedrückt als mol-% der Verzweigungsanhydroglucosen, auf im Vergleich zu unverändertem Amylopektin bzw. Hydroxyethylstärke und sind demzufolge in ihrer Struktur dem Glycogen ähnlicher.

[0019] Der für den erfindungsgemäßen Einsatz erforderliche mittlere Verzweigungsgrad der hyperverzweigten Amylopektine liegt im Bereich zwischen > 10 und 25 mol-%. Dies bedeutet, dass die im Sinne der Erfindung nützlichen Amylopektine im Mittel etwa alle 10 bis 4 Glucoseeinheiten eine  $\alpha$ -(1-6)-Bindung und damit einen Verzweigungspunkt aufweisen. Liegt der Verzweigungsgrad unterhalb von 10 mol-% ist der Abbau des verzweigten Amylopektins (z. B. beim Einsatz als Plasmap Expander) nicht ausreichend verzögert. Ist der Verzweigungsgrad größer als 25 mol-% ist der Abbau zu stark verzögert, so dass ein Einsatz beispielsweise als Plasmapvolumenexpander ausscheidet.

[0020] Eine bevorzugte im medizinischen Bereich einsetzbare Amylopektintypen kennzeichnet sich durch einen Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol-%.

[0021] Weitere bevorzugte hyperverzweigte Amylopektine besitzen einen Verzweigungsgrad im Bereich zwischen 13 und 16 mol-%.

[0022] Daneben kommt auch dem Molekulargewicht Mw der hyperverzweigten Amylopektine eine Bedeutung zu. Das Molekulargewicht Mw bezeichnet das Gewichtsmittel des Molekulargewichts, wie es mit einschlägigen Methoden, die diesen Mittelwert liefern, gemessen werden kann. Hierzu gehören beispielsweise wässrige GPC, HPLC, Lichtstreuung und dergleichen.

[0023] Die in der Erfindung einsetzbaren hyperverzweigten Amylopektine besitzen im Allgemeinen einen Wert für das Gewichtsmittel des Molekulargewichts Mw im Bereich von 40.000 bis 800.000 Dalton. Der untere Grenzwert für den Molekulargewichtsbereich Mw ergibt sich bei den bevorzugten Anwendungen im Wesentlichen aus der sogenannten "Nierenschwelle", die bei hyperverzweigten Verbindungen bei eben etwa 40.000 anzusetzen ist. Ist das Mw kleiner als 40.000 Dalton, würden die Moleküle zu schnell über die Niere abfiltriert werden. Oberhalb eines Mw von 800.000 Dalton wird kein zusätzlicher nennenswerter Nutzen erzielt, obwohl bei globulären Strukturen die Grenzviskosität nicht mehr vom Molekulargewicht abhängt.

[0024] Bevorzugt für den Einsatz als Plasmapvolumenexpander sind Mittelwerte Mw zwischen 90.000 und 300.000 Dalton, ganz besonders zweckmäßig sind Molekulargewichte Mw zwischen 120.000 und 250.000 Dalton.

[0025] Eine besondere Ausgestaltung der Erfindung umfasst hyperverzweigtes Amylopektin, wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol-% und das Molekulargewicht Mw zwischen 90.000 und 300.000 Dalton ist. Weiterhin zweckmäßige Ausgestaltungen der Erfindung schließen hyperverzweigtes Amylopektin ein, wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 13 und 16 mol-% und

das Molekulargewicht Mw zwischen 120.000 und 250.000 Dalton ist.

[0026] Die vorgenannten Parameter Verzweigungsgrad und Molekulargewicht gestatten eine Ziel gerichtete Beeinflussung und somit Hinstellung einer gewünschten Pharmakokinetik, insbesondere des Erreichens eines erwünschten  $\alpha$ -Amylase-Abbaus. Dem Verzweigungsgrad des Amylopektins kommt hierbei eine Schlüsselbedeutung zu. Aber auch das Molekulargewicht hat einen Einfluss auf die angesprochene Kinetik. Daneben kann es auch durch Variation der Verteilung der Verzweigungspunkte gelingen, die Kinetik des Abbaus des Amylopektins in eine gewünschte Richtung zu beeinflussen.

[0027] Von ganz besonderer Bedeutung für den Abbau des Amylopektins durch  $\alpha$ -Amylase und damit für die Funktion als Plasmapvolumenexpander ist jedoch der Verzweigungsgrad. Aufgrund des hohen Verzweigungsgrades erfolgt der Angriff der  $\alpha$ -Amylase stark verzögert bzw. in Bereichen des Moleküls mit einer starken Dichte an Verzweigungspunkten gar nicht mehr, da dort der Zutritt der  $\alpha$ -Amylase nicht mehr möglich ist. Solche Verbindungen sind dennoch abbaubar durch andere Enzyme bis herab zu Oligosacchariden und schließlich Glucose.

[0028] Im Bedarfsfalle können die erfindungsgemäß anzuwendenden hyperverzweigten Amylopektine derivatisiert werden. Derlei Derivate umfassen chemische Abkömmlinge des Amylopektins, wie sie beispielsweise durch chemische oder biotechnologische Umsetzungen erhältlich sind.

[0029] Bevorzugte Derivate des hyperverzweigten Amylopektins sind Hydroxyethyl-, Hydroxypropyl- und Acetyl-Amylopektin. Hiervon wiederum ist Hydroxyethyl-Amylopektin ganz besonders günstig einsetzbar. Auch durch die Derivatisierung ist mithin die Kinetik des Abbaus des Amylopektins beeinflussbar. Es ist jedoch von Vorteil, dass der Grad der Derivatisierung, beispielsweise der Hydroxyethylierungsgrad, in diesen Fällen erheblich niedriger sein muss, um einen vergleichbaren Volumeneffekt bzw. eine ähnliche Pharmakokinetik aufzuweisen, im Vergleich zu einer Hydroxyethylstärke (HRS), die aus normal verzweigtem Amylopektin hergestellt worden ist.

[0030] Die Herstellung von hyperverzweigtem Amylopektin, welches im Sinne der Erfindung unter anderem und bevorzugt zum Einsatz als Plasmap Expander geeignet ist, erfolgt in an sich bekannter Weise durch enzymatische Umwandlung durch sogenannte Verzweigungsenzyme, die die Hydrolyse der  $\alpha$ -1,4-glycosidischen Bindungen und ihre Transformation in  $\alpha$ -1,6-glycosidische Verbindungen katalysieren. Solche sogenannten Transfer-Enzyme können in an sich bekannter Weise z. B. aus Algen extrahiert werden gemäß PCT WO 0018893. Es sind aber auch aus dem US-Patent 4454 161 und EP 0418 945 andere Glycogen-Verzweigungsenzyme bekannt, die ebenfalls entsprechend eingesetzt werden können. Die Durchführung der enzymatischen Transglycosylierung erfolgt in an sich bekannter Weise beispielsweise durch Inkubation von Wachstumsstärke mit den entsprechenden Enzymen unter schonenden Bedingungen bei pH-Werten um ca. 7,5 und Temperaturen bei ca. 30°C in wässriger Lösung. Die Aufarbeitung des Reaktionsansatzes erfolgt anschließend in ebenfalls bekannter Weise, wobei zuvor durch pH-Wert Veränderung bzw. Filtrationsschritte die Enzyme deaktiviert oder entfernt werden.

[0031] In einem anschließenden Hydrolyseschritt, der vorzugsweise durch Salzsäure erfolgt, wird dann das gewünschte Molekulargewicht des Produktes eingestellt. Anschließend wird das Produkt durch Diafiltration mit Membranen mit einem cut off von ca. 3.000 Dalton von niedermolekularen Verbindungen sowie Kochsalz, welches bei der



DE 102 35 954 A 1

Page 4

5

6

Neutralisation des sauren Hydrolyseansatzes entsteht, befreit. Das Produkt wird beispielsweise durch Sprühtrocknung isoliert.

[0032] Neben dem Einsatz als Plasmavolumenexpander sind die hypervverzweigten Amylopektine auch in anderen Bereichen der Medizin nutzbringend einsetzbar.

[0033] So kann das hypervverzweigte Amylopektin bei all denjenigen Anwendungen in der Therapie und Chirurgie zum Einsatz kommen, wo auch übliche HRS-Produkte auf Basis normal verzweigter Stärken einsetzbar sind.

[0034] Neben der Anwendung als Plasmavolumenexpander handelt sich hierbei vorzugsweise um den Einsatz zur Verbesserung der Mikrozirkulation, die Anwendung als Sedimentationshilfe bei der Zellseparation im Rahmen der Leukapherese oder den Einsatz zur Kryokonservierung von Blutkomponenten wie Erythrozyten oder Granulozyten.

#### Modell-Beispiel 1

Vergleichende Abbauprobversuche mit unterschiedlich verzweigten  $\alpha$ -1-4/ $\alpha$ -1-6- Glucosacchariden

[0035] Glycogen von der Auster der Fa. SIGMA wurde durch thermoresistente  $\alpha$ -Amylase BAN 480 L der Fa. NOVOZYMEs in einer DMSO/Wassermischung mit 30%igem Anteil an DMSO bei 70°C und pH Wert von 6,0 abgebaut.

[0036] Der Reaktionsablauf wurde dabei durch Messung der Molekulargewichtsveränderung mittels Gelchromatographie verfolgt und nach ca. 2 Stunden wurde die Reaktion abgestoppt durch Zugabe von Natriumlauge zur Enzyminaktivierung. Nach Neutralisation wurde das Produkt fraktioniert durch Ultrafiltration mittels Cellulose-Acetat-Ultrafilter mit einem nominellen cut-off von 1.000 D und 25.000 D zur Entfernung niedermolekularer Anteile sowie noch hochmolekularer Anteile. Das Produkt wurde anschließend mit Ionenaustauscher Amberlite IR 200 C sowie Aktivkohle behandelt, mit Ethanol gefüllt und bei 80°C getrocknet.

[0037] Der Verzweigungsgrad bestimmt über  $^1\text{H}$  NMR Spektroskopie (Integration der Signale der anomeren Protonen) ergab einen Verzweigungsgrad von 15 mol%, das mittlere Molekulargewicht  $M_w$  betrug 7.000 Dalton.

[0038] Dünnschicht-Wachsmalsstärke ( $\geq 95\%$  Amylopektin) (Fa. Cerestar) wurde in der gleichen Weise behandelt wie vorbeschrieben. Die isolierte, hochverzweigte Fraktion der Verzweigungseinstärke wies einen Verzweigungsgrad von 11 mol-% auf, das mittlere Molekulargewicht  $M_w$  betrug 8.000 Dalton.

[0039] Die hochverzweigten Clusterfraktionen aus Amylopektin und Glycogen wurden danach einem Abbauprobversuch durch Schweinepankreas  $\alpha$ -Amylase (Fa. Roche) in Phosphatpuffer pH 7,2 in 1%iger Lösung bei 37°C und 0,5 IU/ml Enzym unterworfen und die Abbauprobkinetik verfolgt durch Messung der Molekulargewichtsveränderungen mittels Gel-Chromatographie. Ebenfalls wurde ein Vergleichsversuch des Abbaus mit einem handelsüblichen Hydroxyethylstärke-Plasmaexpander durchgeführt (Voluven, Fa. Fresenius Kabi). Dabei waren deutliche Unterschiede in den Abbauprobkinetiken zu verzeichnen. Die Halbwertszeit des Molekulargewichts (Abbau des mittleren Molekulargewichts  $M_w$  der Ausgangssubstanz auf die Hälfte des Ausgangswertes) betrug im Falle der Fraktion mit einem Verzweigungsgrad von 15% 60 Minuten und erreichte dabei die unter gleichen Versuchsbedingungen ermittelte Halbwertszeit wie der Plasmaexpander Voluven.

[0040] Die Halbwertszeit für die Fraktion mit einem mittleren Verzweigungsgrad von 11 mol% betrug hingegen nur 25 Minuten und war damit wesentlich kürzer.

#### Modell-Beispiel 2

[0041] Dünnschicht-Wachsmalsstärke der Fa. Cerestar mit einem mittleren, durch NMR bestimmten Verzweigungsgrad von 4 mol% wurde entsprechend den Angaben aus Beispiel 1 einem Abbauprobversuch durch Schweinepankreas  $\alpha$ -Amylase unterworfen. Hierzu wurde eine 1%ige Lösung im Phosphatpuffer pH 7,2 durch kurzes Erhitzen auf ca. 90°C verdichtet und dem Ansatz nach Abkühlung das Enzym in einer Menge zugesetzt, dass 0,5 I. E. pro ml resultierten.

[0042] Die Versuchstemperatur betrug 37°C.

[0043] Die Abbauprobkinetik wurde verfolgt durch die Erfassung der Molekulargewichtsveränderungen durch Gel-Chromatographie. Unter gleichen Bedingungen wie im Beispiel 1 reduzierte sich das Molekulargewicht der Ausgangssubstanz auf den halben Wert innerhalb von 10 Minuten.

[0044] Im Vergleich zu den hochverzweigten  $\alpha$ -1-4/ $\alpha$ -1-6 Glucosacchariden aus Beispiel 1 wird somit die im mittel relativ niedrigverzweigte, dünnschicht-Wachsmalsstärke so schnell durch  $\alpha$ -Amylase abgebaut, dass sie als Plasmaexpander nicht verwendbar wäre.

[0045] Damit demonstrieren die beiden Modell-Beispiele 1 und 2, dass, auch wenn die Molekulargewichte niedrig sind, eine höhere Verzweigung zu einer Vergrößerung des  $\alpha$ -Amylase-Abbaus führt und dass dieser Effekt zur Herstellung eines Plasmaexpanders einsetzbar ist.

#### Patentansprüche

1. Hypervverzweigtes Amylopektin, das einen mittleren Verzweigungsgrad zwischen > 10 und 25 mol-% und ein mittleres Gewichtsmittel der Molekulargewichte  $M_w$  im Bereich von 40.000 bis 800.000 Dalton aufweist, und Derivate davon zur Anwendung in Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers oder in Diagnostizierverfahren,
2. Hypervverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 als Plasmavolumenexpander,
3. Hypervverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 zur Verbesserung der Mikrozirkulation,
4. Hypervverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 als Sedimentationshilfe bei der Zellseparation im Rahmen der Leukapherese,
5. Hypervverzweigtes Amylopektin nach Anspruch 1 zur Kryokonservierung von Blutkomponenten wie Erythrozyten oder Granulozyten,
6. Hypervverzweigtes Amylopektin nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 11 und 16 mol-% und das Molekulargewicht  $M_w$  zwischen 90.000 und 300.000 Dalton ist,
7. Hypervverzweigtes Amylopektin nach einem der vorhergehenden Ansprüche 1 bis 5 wobei der mittlere Verzweigungsgrad zwischen 13 und 16 mol-% und das Molekulargewicht  $M_w$  zwischen 120.000 und 250.000 Dalton ist.